

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18523

研究課題名(和文)高速AFMを用いたCaMKIIの多量体構造内における記憶のメカニズム解明

研究課題名(英文)HS-AFM studies of molecular mechanisms of learning and memory in CaMKII oligomer

研究代表者

柴田 幹大 (Shibata, Mikihiro)

金沢大学・新学術創成研究機構・准教授

研究者番号：80631027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CaMKIIは脳の神経細胞に存在し、記憶の形成に重要な役割を果たす。CaMKIIは12量体を形成し、Ca²⁺の高頻度刺激を積算(記憶)することができるため、多量体構造の中に“記憶の分子メカニズム”が隠されていると考えられてきたが、その詳細は不明であった。本研究は、CaMKIIに高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を適用し、CaMKIIのハブドメインが信号を積算するために強力な分子集合能力を持つこと、キナーゼドメインが12量体構造を制御すること、さらに、2つを繋ぐリンカー部分の柔軟性が、CaMKIIの活性化に重要であることを実験的に示し、記憶の分子メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CaMKII is enriched in neurons and plays an important role for learning and memory. Because CaMKII forms 12-mer holoenzyme that responds to the frequency of the activating signal of Ca²⁺, an assembly of CaMKII oligomers could be a key element of a molecular mechanism of learning and memory. However, there is no direct evidence that a formation of CaMKII oligomer relates to a memory mechanism.

HS-AFM movies of CaMKII showed solid structures and fluctuated globular structures. By using truncated CaMKII, solid and globular structures were assigned to hub and kinase domains, respectively. Interestingly, 14-mer ring structures were observed in the truncated CaMKII, while 12-mer structures were observed in full-length CaMKII. These results suggest that hub domain has a strong assemble ability, while kinase domain regulates an oligomeric structure of CaMKII. Furthermore, HS-AFM revealed that a flexibility of a linker region is important for the activation of CaMKII.

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質 記憶 プロテインキナーゼ 走査型プローブ顕微鏡 原子間力顕微鏡 高速原子間力顕微鏡 神経科学 ナノサイエンス

1. 研究開始当初の背景

脳機能における記憶・学習の分子メカニズム解明はライフサイエンスにおいて重要な研究課題の1つである。特に、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (以下、CaMKII) は、薬理学実験や遺伝子欠損マウスの実験により、“記憶分子”と考えられており、これまでに様々な研究が行われてきた。CaMKII は Ca^{2+} /カルモジュリン (以下、CaM) の結合により活性化し、隣接するサブユニットのリン酸化 (自己リン酸化) を起こし、様々なタンパク質のリン酸化を調節する。2011 年に解かれた結晶構造によると、CaMKII は 12 量体 (6 量体リングが 2 つ積層した構造) を形成し、不活性化状態では、CaM 結合部位が内部に格納された構造をとることが報告された [1]。しかし、CaMKII が Ca^{2+} の高頻度刺激に応答し、その信号を積算 (記憶) するためには、活性化状態にあるサブユニットが不活性化状態に戻る前に、別のサブユニットが活性化する必要がある、つまり、多量体構造に信号を積算できる理由があるのだらうと推測されてきたが、その詳細なメカニズム (12 量体内のサブユニット間での協同効果など) は全くの不明であった。

2. 研究の目的

本研究は“記憶分子 CaMKII”の Ca^{2+} /CaM の結合に伴う構造変化を高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) で直接可視化し、高頻度刺激に履歴応答する分子メカニズムを明らかにすることが目的である。高い空間分解能と時間分解能を併せ持つ高速 AFM を用い、12 量体を構成するサブユニットが、どのタイミングで構造変化 (活性化状態) を起こし、同時に、どこのサブユニットが元の状態へ戻る (不活性化状態) のかといった CaMKII の動的な構造情報を得る。

3. 研究の方法

(1) HEK293 細胞を用いてラット由来の CaMKII (CaMKII α) を発現し、6x His タグで単離・精製する。最初に、CaMKII α の高速 AFM 画像に現れるハブドメインとキナーゼドメインを明確にするため、ハブドメインだけを発現した CaMKII α -Hub の高速 AFM 観察を行う。

(2) Ca^{2+} /CaM が結合していない不活性化状態の全長 CaMKII α に対して高速 AFM を適用し、キナーゼドメインの動態を可視化する。特に、12 量体中のどこのサブユニットが特異的に動くのか、もしくは、ランダムに動くのかを明らかにする。

(3) Ca^{2+} /CaM 結合に伴うキナーゼドメインの動的構造変化を可視化し、12 量体内の協同効果を明らかにする。 Ca^{2+} /CaM は CaMKII のハブドメインとキナーゼドメインの間のリンカ領域に結合するので、 Ca^{2+} /CaM の結合

に伴う、リンカ領域の動態に着目する。さらに、CaM の濃度を変えることで協同効果の有無を検証する。具体的には、高速 AFM 画像から、 Ca^{2+} /CaM が結合したキナーゼドメインの分子数をカウントし、12 量体内の、どこのサブユニットがどのタイミングで構造変化を起こすのか? 構造変化を起こす順番は 12 量体内で均一なのか? を明らかにする。さらに、EDTA を添加することで、 Ca^{2+} /CaM を CaMKII α から解離させ、キナーゼドメインの動態が、不活性化状態へ戻るのか、コントロール実験も行う。

4. 研究成果

(1) 最初に、CaMKII α を HEK293 細胞で発現し、6x His タグのみで精製した試料を用いて高速 AFM 観察を行った。ところが、試料の精製度が低く、AFM 基板には CaMKII α 以外の物体が数多く観察された。そこで、6x His タグに加え、Flag タグを付加し、2 段階の精製を行ったところ、高純度な CaMKII α の生成に成功し、直径 15 nm、高さ 10 nm 程度のリング構造と、それを取り囲む球状構造を観察することができた (図 1 右図)。ここで、ハブドメインのみを発現した CaMKII α -Hub の高速 AFM 観察を行ったところ、リング構造だけが観察され、周りを取り囲む球状構造は観察されなかった (図 1 左図)。この結果から、高速 AFM 画像に現れるリング構造はハブドメイン、球状構造はキナーゼドメインに由来すると結論付けた。興味深いことに、ハブドメインのみを発現した CaMKII α -Hub は、7 つのサブユニットがリング構造を形成し、そのリングが上下に重なったダブルリング 14 量体構造を形成するが、キナーゼドメインまで含む全長 CaMKII α では、6 つのサブユニットが上下に重なったダブルリング 12 量体構造を形成することが分かった。これは、ハブドメインはサブユニット同士を強力に集合させ 14 量体を最安定構造にしようとするが、キナーゼドメインによって、最安定構造が 12 量体へと変化するという多量体構造におけるアロステリック効果を強く示唆する結果である。このようなアロステリック効果は、これまでに報告がなく、研究当初予期していなかったことであり、今後は、このアロステリック効果を生み出す CaMKII α の構造的な

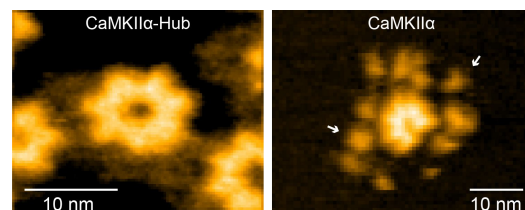


図 1 CaMKII α -Hub (左図) と全長 CaMKII α (右図) の高速 AFM 画像。1 秒間に 1 枚のフレームレートで高速 AFM 観察を行った。真ん中のリング構造がハブドメイン、その周りを取り囲む球状構造がキナーゼドメイン (白矢印)。キナーゼドメインは、ハブドメイン方向へ伸縮するようなダイナミックな動きが観察された。

要因を研究する予定である。

(2) 全長 CaMKII α に対し、観察バッファアの塩濃度を検討することで、CaMKII α と AFM 基板との吸着をコントロールし、キナーゼドメインとリンカー領域の柔軟な揺らいだ構造を可視化することに成功した(図2)。このキナーゼドメインの揺らぎは、多量体を構成するサブユニットに特異性はなく、全くのランダムであるように見える。さらに、CaMKII α の阻害剤、KN-93 を観察バッファアに添加し高速 AFM 観察を試みたところ、柔軟なキナーゼドメインとリンカー領域が固い構造に変化することを見出した。KN-93 は Ca²⁺/CaM の結合を阻害するため、キナーゼドメインとリンカー領域の柔軟な構造が、Ca²⁺/CaM の結合に重要であることが示唆された。

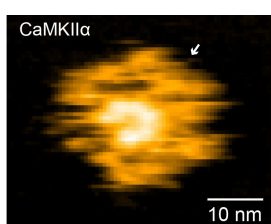


図2
200 mM KCl バッファア
ー中での CaMKII α の高
速 AFM 画像。高速 AFM
画像ではキナーゼドメ
イン(白矢印)がばやけ
て観察される。これはダ
イナミックな揺らいだ
構造をとることを意味
する。

(3) 次に、観察バッファアに Ca²⁺/CaM を加え、Ca²⁺/CaM の結合に伴う CaMKII α の構造変化を可視化することを試みた。いくつかの高速 AFM 動画には、Ca²⁺/CaM が、CaMKII α のリンカー部位に結合する様子が観察されたが、現状では、実験回数を増やし再現性を取る必要がある。また、結合する Ca²⁺/CaM の濃度を変え、12 量体内の協同的効果の検証も、同様に、再現性をとる必要がある。本研究課題は、今後も引き続き行う予定である。

これらの高速 AFM 観察から、CaMKII α の信号積算分子メカニズムを考察する。まずハブドメインは、信号を積算するための強力な分子集合能をもち、12 か 14 量体の安定なダブルリング構造を形成する。キナーゼドメインは Ca²⁺/CaM の結合と、他の分子をリン酸化する働きを持つが、CaMKII α の多量体構造を 12 量体へと制御する。また、キナーゼドメインとリンカー領域は柔軟で揺らいだ構造であり、この揺らぎは、Ca²⁺/CaM の結合に重要であることが分かった。おそらく、常に揺らいだ構造をとることで、Ca²⁺/CaM の結合を促進すると考えられる。また、キナーゼドメインの揺らぎは、多量体内のサブユニットにおいて、完全にランダムであるので、Ca²⁺/CaM の結合には、協同的効果はないと考えられる。しかしながら、今後も本研究を続け、Ca²⁺/CaM の結合に伴う CaMKII α の構造変化を明確に可視化し、12 量体内に潜む協同的効果の有無をさらに詳細に検証する。

<引用文献>

L. H. Chao *et al.* A mechanism for tunable

autoinhibition in the structure of a human Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II holoenzyme.、Cell、146 巻、2011、732-745.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

柴田 幹大、西増 弘志、古寺 哲幸、平野 清一、安藤 敏夫、内橋 貴之、濡木 理、Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy.、Nat. Commun.、査読有、8 巻、2017、1430 (9 頁)

DOI:10.1038/s41467-017-01466-8

柴田 幹大、渡辺 大輝、内橋 貴之、安藤 敏夫、安田 涼平、High-speed atomic force microscopy imaging of live mammalian cells.、Biophys. Physicobiol.、査読有、14 巻、2017、127-135

DOI:10.2142/biophysico.14.0_127

松井 秀介、広重 聖奈、呉羽 拓真、柴田 幹大、内橋 貴之、鈴木 大介、Fast adsorption of soft hydrogel microspheres on solid surfaces in aqueous solutions.、Angew. Chem. Int. Ed.、査読有、56 巻、2017、12146-12149

DOI:10.1002/anie.201705808

井上 圭一、伊藤 奨太、加藤 善隆、野村 佑梨香、柴田 幹大、内橋 貴之、角田 聡、神取 秀樹、A natural light-driven inward proton pump.、Nat. Commun.、査読有、7 巻、2016、13415 (10 頁)

DOI: 10.1038/ncomms13415

[学会発表](計57件)

柴田 幹大、生体分子の動きを観る高速原子間力顕微鏡、自然科学研究機構新分野創成センターシンポジウム「分野横断・分野融合研究による生命創成を探索する新しい科学の創成」、2018 年

柴田 幹大、高速バイオ AFM による生体分子のナノイメージング、金沢大学新学術創成研究機構異分野融合研究会「がん研究と高速バイオ AFM」、2018 年

柴田 幹大、西増 弘志、古寺 哲幸、平野 清一、安藤 敏夫、内橋 貴之、濡木 理、High-speed AFM visualized DNA cleavage reaction of CRISPR-Cas9.、International Symposium on Atomic Force Microscopy at Solid-Liquid Interfaces、2017 年

柴田 幹大、High-speed AFM imaging of membrane proteins in lipid nanodiscs.、第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年

柴田 幹大、タンパク質の動きを観るビデオ撮影原子間力顕微鏡、XFEL 構造生物ミーティング、2017 年

柴田 幹大、高速原子間力顕微鏡のバイオ応用研究、テニユアトラック教員ランチセミナー、2017 年

柴田 幹大、高速 AFM による生体分子のナノスケールイメージング、革新的統合バイオ研究コアワークショップ「多様な生命現象の数理モデル研究」、2017 年

柴田 幹大、高速原子間力顕微鏡によるナノスケールで見る神経細胞スパイン表面のリアルタイムイメージング、花王芸術・科学財団 H28 年度助成研究発表交流会、2017 年

柴田 幹大、内橋 貴之、High-speed atomic force microscopy imaging of oligomeric states of microbial rhodopsins.、International Symposium on Biophysics of Rhodopsin、2017 年

柴田 幹大、内橋 貴之、Nanoscale Visualization of Membrane Proteins by High-Speed Atomic Force Microscopy.、日本化学会第 97 回春季年会、2017 年

柴田 幹大、高速 AFM を用いたナノバイオイメーキング、金沢大学理学談話会、2017 年

柴田 幹大、高速 AFM による生きた細胞のナノスケール観察、第 1 回生体界面研究会若手の会、2017 年

柴田 幹大、高速原子間力顕微鏡によるナノバイオイメーキング、第 2 回新学術創成研究機構シンポジウム、2017 年

柴田 幹大、古寺 哲幸、内橋 貴之、安藤 敏夫、Visualization of protein molecules in action by high-speed atomic force microscopy.、第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年

柴田 幹大、Nanoscale imaging of living cells by high-speed AFM.、岡崎統合バイオリトリート 2016、2016 年

柴田 幹大、内橋 貴之、安藤 敏夫、Nanoscale visualization of morphological dynamics of living neurons by high-speed

atomic force microscopy.、第 89 回日本生化学会大会、2016 年

柴田 幹大、High-speed atomic force microscopy for nano-scale imaging in live cells.、OptoBioTechnology Symposium on “Membrane Protein Dynamics.、2016 年

〔図書〕(計 1 件)

古寺 哲幸、柴田 幹大、医歯薬出版株式会社、高速原子間力顕微鏡で観察したミオシン、バクテリオロドプシンの 1 分子動態、2017、3136

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：走査型プローブ顕微鏡
発明者：内橋 貴之、柴田 幹大、古寺 哲幸
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願2016-234584号
出願年月日：平成 28 年 12 月 1 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

Watch CRISPR edit genes in real time

<http://www.sciencemag.org/news/2017/11/watch-crispr-edit-genes-real-time>

An Astonishing Video Shows CRISPR Editing DNA

<https://www.theatlantic.com/science/archive/2017/11/crispr-video-real-time/545603/>

The top CRISPR papers of 2017

<http://blogs.nature.com/ofschemesandmemes/2018/01/16/our-10-most-popular-crispr-papers-of-2017>

高速原子間力顕微鏡によって可視化された CRISPR-Cas9 の実空間でのリアルタイム動態

<https://www.natureasia.com/ja-jp/ncomms/abstracts/90764>

A Breathtaking New GIF Shows CRISPR Chewing Up DNA

<https://www.yahoo.com/news/breathtaking-gif-shows-crispr-chewing-000200485.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田 幹大 (SHIBATA, Mikihiro)

金沢大学・新学術創成研究機構・准教授

研究者番号：80631027